

—原著—

発光ダイオード (LED) 光源が ICSI成績に及ぼす影響について

Effects of Light Emitting Diode (LED) illumination in ICSI

山上 一樹*・古橋 孝祐・岩崎 利郎・伊藤 宏一・
水澤 友利・岡本 恵理・苔口 昭次・塩谷 雅英

Kazuki Yamagami*, Kohyu Furuhashi, Toshiroh Iwasaki, Koichi Ito,
Yuri Mizusawa, Eri Okamoto, Shoji Kokeyuchi and Masahide Shiotani

英ウイメンズクリニック 〒650-0021 神戸市

Hanabusa Women's Clinic, Sannomiya Central Building 7 and 8th floor, 1-1-2 Sannomiya-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo
650-0021, Japan

要旨: 近年、発光ダイオード (LED) の普及により、顕微鏡の光源にもLEDを選択することが可能になっているが、ヒト胚をLED光源に曝露した場合の影響についての報告はほとんどない。そこで本検討では、LED灯あるいはハロゲン灯を接続した同型の倒立顕微鏡を用いて、光源の違いが顕微授精 (ICSI) 成績に与える影響について比較検討を行った。ハロゲン群703周期 (2,122個) およびLED群687周期 (2,041個) において、LED群の分割率はハロゲン群と比較して有意に高く (92.6% vs 94.4% $P = 0.027$)、正常受精あたりの良好分割率はハロゲン群で有意に高い値を示した (55.0% vs 51.3% $P = 0.03$)。一方で、Day5、Day6胚盤胞発生率、Day5 G3BB以上胚盤胞率、臨床妊娠率および流産率において、両群間に有意な差は認められなかった。以上の結果、LED光源はハロゲン光源と比較して初期胚発生に影響を与えることが示唆されるものの最終的な胚盤胞発生および妊娠成績に影響しなかったことから、ヒト胚ICSIにおいて使用して差し支えないものと考えられた。

キーワード: ICSI, 発光ダイオード, LED

Abstract: In recent years, it has become possible to use light-emitting diodes (LEDs) as a light source for microscopes, but there have been few reports on the effects of exposing human oocytes to LED light. In this study, we compared the effects of different light sources on ICSI results using the same type of inverted microscope connected to LED or halogen lamps. In 703 cycles (2,122) of the halogen group and 687 cycles (2,041) of the LED group, the embryo cleavage rate of the LED group was significantly higher than that of the halogen group (92.6% vs 94.4% $P = 0.027$), and the good cleavage rate per normal fertilization was significantly higher in the halogen group (55.0% vs 51.3% $P = 0.03$). On the other hand, there were no significant differences in the Day 5 and Day 6 blastocyst development rates, good blastocyst rate on Day 5, clinical pregnancy rate, or miscarriage rate between the two groups. These results suggest that a LED light source may affect early embryonic development compared to halogen lamp light, but does not affect the final blastocyst development or pregnancy outcome, further suggesting that LED light is safe to use in human embryo ICSI.

Key words: ICSI, LED, Light Emitting Diode

(受付 2021年12月26日/受理 2022年2月4日)

別刷請求先: 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2

三宮セントラルビル

医療法人社団英ウイメンズクリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: yamagami@hanabusaclinic.com

はじめに

哺乳類の胚は本来、光の届かない体内で発生する。しかしながら、生殖補助医療において、生体外での胚操作は不可欠であり、胚は本来さらされることのないはずの光に曝露されることとなる。

本来出会うことのない光にさらされたとき、胚にはどのような影響が表れるのだろうか。

ウサギ胚は20分～30分間蛍光灯に曝露しても正常な胎仔に発生することから、光曝露の影響は少ないと考えられている¹⁾。また、マウス未受精卵は蛍光灯に1～4時間曝露しても、分割率は低下しないことが報告されている²⁾。一方で、マウス前核期胚を蛍光灯に15分、あるいは太陽光に1分曝露した場合、90%以上が胚盤胞へと発生するもの、光制御区と比較して生産率が半分以下に低下することが報告されている³⁾。また、蛍光灯に曝露したマウス胚は、活性酸素種の生成増加により酸化ストレスを受けアポトーシス頻度が上昇することが知られている³⁾。

さらに、ハムスターの受精卵では、蛍光灯曝露によって分割率は大きく低下し、蛍光灯を使用しない赤色光下での顕微授精においてのみ胚発生が継続することが報告されている⁴⁾。以上のように、胚操作における光曝露の影響は動物種によってさまざまであり、光曝露条件の選択には慎重になるべきである。

近年、発光ダイオード(LED)の普及により、顕微鏡光源においてもLEDを選択することが可能となっている。LEDは、長寿命であることや熱の発生を抑えられるといった特徴から様々な分野で使用されている。マウス胚において、青色LEDの照射時間依存的に胚盤胞発生率が低下することが報告されているが⁵⁾、ヒト胚におけるLED光源使用の影響についてはほとんど報告されていない。そこで本検討では、従来使用されているハロゲン灯とLED灯を比較し、光源の違いが顕微授精(ICSI)成績に与える影響について検討を行った。

対象と方法

2018年5月から2019年7月に当院で採卵を行ったICSI施行症例について検討を行った。採卵した卵子はUniversal IVF Medium (Origio, Denmark)中で採卵から3～5時間の前培養を行った。精子は横田ら⁶⁾の方法に従い、2層パーコール法で遠心分離を行い、良好な精子を回収した。前培養後に顆粒膜細胞を除去した卵子に、形態が正常な運動精子を不動化して穿刺注入した。ICSIにはハロゲン灯あるいはLED灯を接続した、光源のみが異なる同型の倒立顕微鏡(IX73, OLYMPUS, Japan)およびインジェクションシステム(TAKANOME, NARISHIGE, Japan)を使用した。ICSI施行時、患者毎に無作為にハロゲン群、又はLED群に振り分けた。当院では、ICSI1個当たり5分未満で施行完了するよう定めており、また、一度にdishに置く卵子数は5個までとしている。受精確認はICSI後18～20時間に行った。培養にはSAGE 1-step medium (Origio)を用い、受精から2日目に培養液交換を行った。一部の症例では、Day2時点で分割胚の一部を凍結保存した。受精確認、培養液交換、受精卵凍結処理はLED光源を搭載した実体顕微鏡下で行った。卵子、胚は37°C、5.5%CO₂、5.0% O₂、89.5% N₂の気相条件下で培養を行った⁷⁾。分割期胚の評価はVeeckの分類⁸⁾を用いた。本

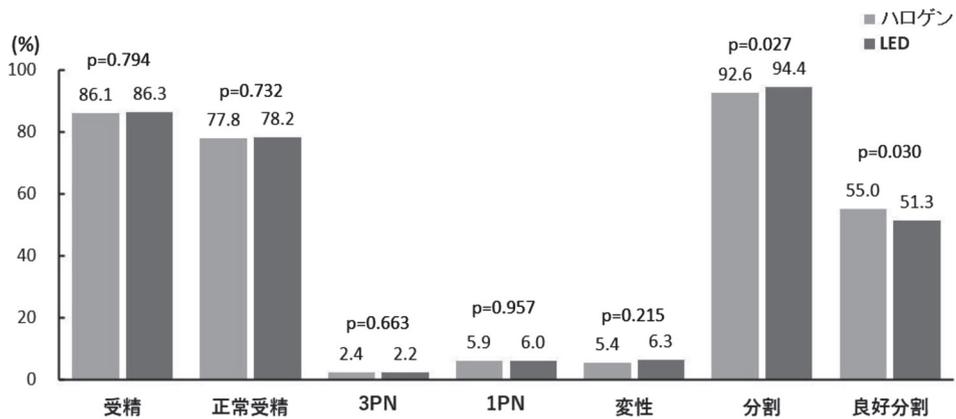
検討では採卵日をDay0としてDay2時に4cellGrade 1およびGrade 2、または5 cell以上Grade 3以上の胚を良好分割期胚と定義し、結果の集計を行った。また、胚盤胞の評価はGardnerの分類⁹⁾を用いた。本検討では、受精率、正常受精率、3PN率、1PN率、変性率、分割率、正常受精当たりの良好分割率、継続培養胚当たりのDay5、Day6胚盤胞発生率、Day5 G3BB以上胚盤胞率を比較検討した。また、本検討中に得られた胚盤胞で2021年5月までに凍結融解単一胚盤胞移植を行った症例について、胎嚢確認を臨床妊娠陽性として臨床妊娠率、および、胎嚢確認後22週までに妊娠不継続となった症例を流産と定義した流産率を比較した。培養成績の統計学的解析には χ^2 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。患者背景の統計学的解析にはt検定を用い $P < 0.05$ を有意差ありとした。なお、本研究は英ウィメンズクリニック倫理委員会の承認を受けている。

結果

ハロゲン群703周期(2,122個)およびLED群687周期(2,041個)に対して検討を行った。平均年齢はそれぞれ40.4 ± 4.3歳、40.2 ± 4.4歳、前医を含んだ平均ART回数はハロゲン群で6.3 ± 6.9回、LED群で6.2 ± 6.4回であり、両群間の患者背景に有意な差は認められなかった。また、ハロゲン群およびLED群それぞれの採卵時夫年齢は41.5 ± 6.5歳、41.3 ± 6.3歳、精液量は2.65 ± 1.32 ml、2.78 ± 1.34 ml、精子濃度は65.3 ± 55.3 × 10⁶/ml、60.3 ± 52.9 × 10⁶/ml、運動精子濃度は29.7 ± 33.3 × 10⁶/ml、27.1 ± 32.0 × 10⁶/mlであり、いずれの項目においても両群間に有意な差は認められなかった。

ハロゲン群、LED群において、受精率(86.1% vs 86.3%; $P = 0.794$)、正常受精率(77.8% vs 78.2%; $P = 0.732$)、3PN率(2.4% vs 2.2%; $P = 0.663$)、1PN率(5.9% vs 6.0%; $P = 0.957$)、変性率(5.4% vs 6.3%; $P = 0.215$)となり有意な差は認められなかった。分割率はLED群で有意に高い値を示し(92.6% vs 94.4%; $P = 0.027$)、一方で、良好分割率はハロゲン群で有意に高い値が得られた(55.0% vs 51.3%; $P = 0.030$) (図1)。また、継続培養胚当たりのDay5胚盤胞発生率(44.8% vs 44.6%; $P = 0.917$)、Day5 G3BB以上胚盤胞率(19.6% vs 20.0%; $P = 0.724$)、Day5、Day6胚盤胞発生率(51.7% vs 51.6%; $P = 0.949$)において両群間に有意な差は認められなかった(図2)。

本検討によって得られた胚盤胞における単一凍結融解胚盤胞移植において、平均移植時年齢はハロゲン群(246症例353周期)で37.7 ± 4.4歳、LED群(273症例388周期)で37.1 ± 4.4歳であり、有意な差は認められなかった。臨床妊娠率(33.4% vs 34.3%; $P = 0.807$)および流産率(28.8% vs 29.3%; $P = 0.929$)を比較検討したところ、両群間に有意な差は認められなかった(図3)。

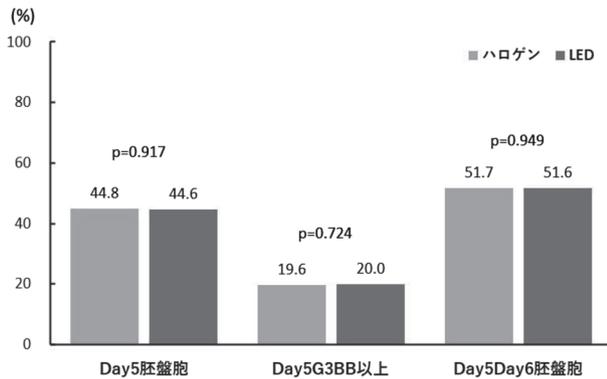


	施行	受精	正常受精	3PN	1PN	変性	分割	正常受精当たりの 良好分割※
ハロゲン	2122	1826	1650	50	126	114	1690	908
LED	2041	1762	1596	44	122	128	1663	819 (個)

(※4cell1, G2もしくは5cellG3以上)

図1 受精分割における各光源の影響

分割率はLED群で有意に高い値を示した ($P = 0.027$)、一方で、良好分割率はハロゲン群で有意に高い値が得られた ($P = 0.030$)。



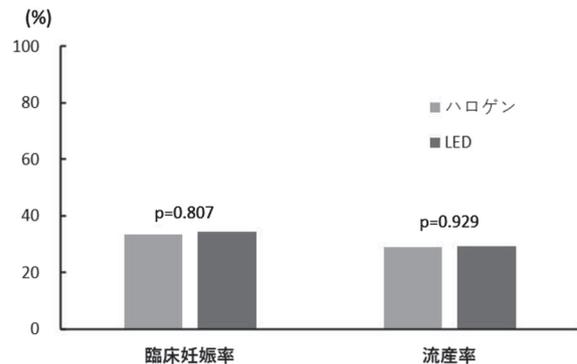
	継続培養	Day5胚盤胞	Day5G3BB以上	Day5Day6胚盤胞
ハロゲン	1172	525	230	606
LED	1144	510	229	590 (個)

図2 胚盤胞発生における各光源の影響

継続培養胚当たりのDay5胚盤胞発生率 ($P = 0.917$)、Day5 G3BB以上胚盤胞率 ($P = 0.724$)、Day5、Day6胚盤胞発生率 ($P = 0.949$) において両群間に有意な差は認められなかった。

考 察

本検討では、顕微鏡の光源として近年定着しつつあるLED光源について、ICSI施行時の影響についてハロゲン光源との比較検討を行った。



	周期	臨床妊娠	流産
ハロゲン	353	118	34
LED	388	133	39 (件)

図3 臨床妊娠率および流産率における各光源の影響

臨床妊娠率 ($P = 0.807$) および流産率 ($P = 0.929$) において、両群間に有意な差は認められなかった。

初めに、受精時に及ぼす影響において、ハロゲン群およびLED群の間に有意な差は認められなかった。

一方、LED群はハロゲン群と比較して分割率において有意に高い値を示し、良好分割率では有意に低い値を示した。哺乳類卵子への光曝露の主な影響として、活性酸素種の生成増加による酸化ストレスの発生が挙げられるが、この酸

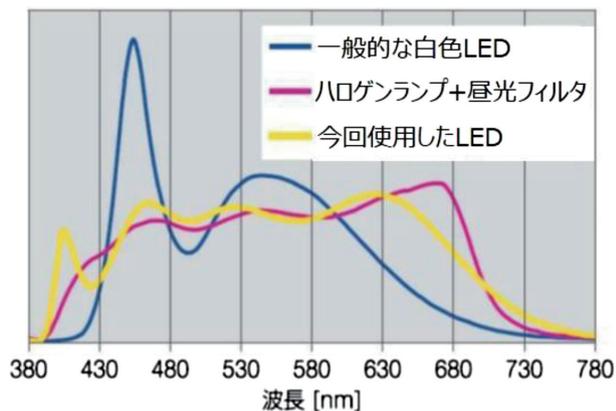


図4 本検討に用いたLED光源の分光特性

<https://www.olympus-lifescience.com/ja/microscopes/upright/bx53f2/>より引用。OLYMPUS株式会社より掲載許可を頂戴した。

化ストレスによって初期胚の分割速度が低下することが報告されている¹⁰⁾。今後、各光源ごとに曝露後の活性酸素種生成量の測定を行うことで、本検討において分割率および良好分割率に差が生じた原因を明らかにすることが可能かもしれないと考えている。

さらに、本検討ではDay5胚盤胞発生率、Day5 G3BB以上胚盤胞率、Day5、Day6合計の胚盤胞発生率において両群間で有意な差は見られなかった。加えて、凍結融解単一胚盤胞移植の臨床妊娠率および流産率においてもまた、LED群はハロゲン群と比較して有意な差が認められなかった。これらの結果から、両群により得られた胚盤胞は同程度の質であったものと推測される。顕微鏡メーカーによると、本検討に用いたLED光源は一般的な白色LEDと比較して短波長領域がカットされており、ハロゲンランプに近い分光特性に加工されているとのことである(図4)。そのため、ICSI時における光源の違いが培養成績に影響しなかったのではないかと考えられる。また、当院ではICSI施行時間は卵子1個当たり5分以内を目安とし、dishに一度に置く卵子は5個までと定めているため、作業間で光曝露時間に大きな差は無かったものと考えられる。

マウス胚において、光曝露によって高頻度のアポトーシスが発生した胚盤胞の移植では胎仔発生率が大きく減少したとの報告が為されている¹¹⁾。本検討ではアポトーシス頻度を測定してはいないが、近年、紫外線照射によってアポトーシスを誘導したマウス胚盤胞において、培養液上清中のmicroRNA (MiR-294)が増加することが報告されている¹²⁾。MicroRNAは胚発生の重要な制御因子であると考えられており、さらに、aneuploid胚はeuploid胚と比較してmicroRNAの発現が増加することが報告されているため、培養液上清中のmicroRNAの測定は胚の質を調べるための非侵襲的マーカーとして期待されている^{13, 14)}。非侵襲的に受精卵のアポトーシス発生頻度を測定することが可能となれ

ば移植胚選択精度の向上が期待されるため、microRNA発現の変化を詳細に検討することは今後の生殖補助医療の品質向上につながるかもしれない。

最後に、本検討ではICSI以降の胚観察は両群ともLED光源を搭載した実体顕微鏡下で行っている。胚観察は必要最低限の短時間で完了するため、胚観察時の光曝露による影響は極めて少ないものと考えている。しかしながら、本検討ではICSI穿刺時の光源の違いにのみ着目しているものの、胚観察時も含めた光源の違いについてさらに深く検討する余地があり、今後の検討課題である。

以上、本検討より、ICSIにおけるLED光源の使用は初期胚分割率および良好分割率に影響する可能性はあるものの、最終的な胚盤胞発生および妊娠成績に影響しなかったことから、LED光源はヒト胚ICSI施行時に使用して差し支えないことが示唆された。

文 献

- 1) Bedford, J.M. and Dobrenis, A. (1989): Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, 85, 477-481.
- 2) Barlow, P., Puissant, F., Zwalmen, P., Vandromme, J., Trigaux, P. and Leroy, F. (1992): In vitro fertilization, development, and implantation after exposure of mature mouse oocytes to visible light. *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 297-302.
- 3) Takenaka, M., Horiuchi, T. and Yanagimachi, R. (2007): Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 104, 14289-14293.
- 4) Yamauchi, Y., Yanagimachi, R. and Horiuchi, T. (2002): Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.*, 67, 534-539.
- 5) 伊東 彩・Jaforbapary, M.A.・相馬祥吾・高野淳一郎・山海 直 (2017) : 青色LEDライトが生殖細胞および体細胞に及ぼす影響. 日本卵子学会誌, 2: S63.
- 6) 横田梨恵・古橋孝祐・辻 優大・大月純子・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・苔口昭次・塩谷雅英 (2017) : 2種類の精子調整法における培養成績の比較. 日本IVF学会誌, 20: 21-24.
- 7) 角本知世・後藤 栄・橋本洋美・泉 陽子・江口素子・古橋孝祐・水田真平・田中里美・稲飯健太郎・片田雄也・宮田ちさと・米山雅子・黒田泰史・岸加奈子・松浦まき・後藤優介・東山龍一・成松美彩・松本由紀子・苔口昭次・塩谷雅英 (2009) : 2種類の培養液を用いた培養成績の検討. 日本臨床エンブリオロジスト学会講演抄録集・実技書, 15: 24.
- 8) Veck, L.L. (1991): Atlas of the human oocyte and early conceptus, 2nd ed, pp. 151-153, Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- 9) Gardner, D.K. and Schoolcraft, W.B. (1999): Towards reproductive certainty: Fertility & genetics beyond. *Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics*, pp. 347-371, Carnforth Parthenon Press, Boca Raton.
- 10) Truong, T. and Gardner, D.K. (2017): Antioxidants

- improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum. Reprod.*, 32: 2404–2413.
- 11) Horiuchi, T. (2013): Effect of in vitro Manipulation on Development of Pre-implantation Embryos: Lecture of Light Effects. *J. Mamm. Ova Res.*, 30, 120–126.
 - 12) Makri, D., Efstathiou, P., Michailidou, E. and Maalouf, W.E. (2020): Apoptosis triggers the release of microRNA miR-294 in spent culture media of blastocysts. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 37, 1685–1694.
 - 13) McCallie, B., Schoolcraft, W.B. and Katz-Jaffe, M.G. (2010): Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil. Steril.*, 93, 2374–2382.
 - 14) Liang, J., Wang, S. and Wang, Z.(2017): Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 15, 90.